

Exhibit 18

ANTICARCINOGENIC AGENT**Publication number:** JP62145026**Publication date:** 1987-06-29**Inventor:** KAWAI YASUO; SUEKARA NOBUO; OKAZAKI HIDE**Applicant:** ADVANCE KK**Classification:****- International:** A61K35/74; A61P35/00; A61P39/02; A61K35/66;

A61P35/00; A61P39/00; (IPC1-7): A61K35/74

- European: A61K35/74; C12R1/01; C12R1/225; C12R1/46**Application number:** JP19850284329 19851219**Priority number(s):** JP19850284329 19851219**Also published as:** EP0228861 (A2) EP0228861 (A3) EP0228861 (B1)[Report a data error here](#)**Abstract of JP62145026**

PURPOSE: To provide an anticarcinogenic agent containing microbial cell of *Streptococcus* genus, *Bifidobacterium* genus or *Lactobacillus* genus as an active component and capable of effectively lowering dimethylnitrosamine known as a carcinogenic substance. **CONSTITUTION:** The objective anticarcinogenic agent contains the cells of a strain belonging to *Streptococcus* genus (e.g. *Streptococcus faecium*, *Streptococcus faecalis*, etc.), *Bifidobacterium* genus (e.g. *Bifidobacterium adpressantis*) or *Lactobacillus* genus (e.g. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, etc.) as an active component. The above microbial cell remarkably effectively decreases the level of dimethylnitrosamine in the body and is useful as a preventive for cancer including the cancer of digestive organ (especially gastric cancer and hepatic cancer).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑩ 公開特許公報 (A) 昭62-145026

⑩ Int. Cl.

A 61 K 35/74

説別記号

ADU

庁内整理番号

7138-4C

7138-4C

⑩ 公開 昭和62年(1987)6月29日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑩ 発明の名称 抗発癌剤

⑩ 特 願 昭60-284329

⑩ 出 願 昭60(1985)12月19日

⑩ 発 明 者 河 合 康 雄 厚木市毛利台2-8-12

⑩ 発 明 者 末 綱 信 夫 神奈川県津久井郡城山町川尻3256-5

⑩ 発 明 者 岡 崎 秀 相模原市下九沢767

⑩ 出 願 人 株式会社アドバンス 東京都中央区日本橋小舟町5番7号

明 細 書

1. 発明の名称

抗発癌剤

2. 特許請求の範囲

- (1) ストレプトコッカス属、ビフィドバクテリウム属、及びラクトバチルス属のいずれかに属する微生物の菌体を有効成分として含有することを特徴とする抗発癌剤。

- (2) 菌配製生物が、ストレプトコッカス・フェシウム、同フェカリス、同エビウム、同ミチス、同サリヴァリス、同ゴービス、同エタナス、ビフィドバクテリウム・アドレンシス、同ブレバ、同ロンガム、ラクトバチルス・アシドフィルス、同ランタム、同ブレビス、同カゼイ、同ファーマンタム、同サリヴァリス、同ヘルベティクスより成る群から選択される1種又は2種以上であることを更に特徴とする特許請求の範囲第(1)項に記載の抗発癌剤。

- (3) 菌配製生物がストレプトコッカス・フェシウムAD1008(P 6 R M P-4562)、同フェカリスAD 0003(P 6 R M P-3572)、同エビウムAD 1007(P 6 R M P-4574)、ビフィドバクテリウム・ブレバAD 0055(P 6 R M P-4572)、同アドレ

センシスAD 0032(P 6 R M P-4574)及び/又はラクトバチルス・アシドフィルスAD 0005(P 6 R M P-4563)、同サリヴァリスAD 0004(P 6 R M P-4560)であることを、更に特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の抗発癌剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、有効成分としてストレプトコッカス属に属する微生物、ビフィドバクテリウム属に属する微生物/又はラクトバチルス属に属する微生物の菌体を含有する抗発癌剤に関する。

今日、日本人の死亡率の第1位は癌による死亡であり、とくに消化器癌が多い。これら癌の予防、予防薬としては、免疫賦活剤が主として幾つかが提案されているが、死亡の減少は全く見えずつづけている状態である。これらは著意増長及び制御等の点で必ずしも充分満足し得るものとは言い難く、より効果的な薬剤の需求が一般とされている。上記に鑑み、本発明者らは、癌発生の原因、ストレプトコッカス属、ビフィドバクテリウム属又はラクトバチルス属に属する微生物の生菌体及び死菌体が、消化器癌の原因物質である強力発癌物質ジメチルニトロソアミンを効果的に低下せしめ得るものであり、且つ、その経路が癌細胞内細胞であるこれら菌体は、癌口では実質的阻害性であることを発見し、本発明に至ったものである。

特選頭62-145026(2)

以下、本図明に係る微生物の識別と図学的性質、スクリーニング方法、菌体調製法及び菌体培養等について詳細に分類する。

微生物

ストレプトコッカス属、ビフィドバクテリウム属又はラクタバチルス属に属する微生物であり、液中、ストレプトコッカス・フェシウム(*Streptococcus faecium*)、間フェカリス(*faecalis*)、両エビウム(*avium*)、両ミチス(*mitis*)、両エキチナス(*exiguus*)、両サリヴァリス(*salivarius*)、両ロービス(*bovis*)、両デュラナス(*durans*)、ビフィドバクテリウム・アドレセンチス(*Bifidobacterium adolescentis*)、両ブレベ(*breve*)、両ロングム(*longum*)、両インファンチス(*infantis*)、両ビフィダム(*bifidum*)、両サーモフィラム(*thermophilum*)、両シェドロンガム(*pseudo-longum*)、両コリネフォルム(*corneiforme*)、両アスタロイダス(*asteroides*)、両インディカム(*indicum*)、両スイス(*autis*)、両ラクトバチルス・アンドフィルス(*Lactobacillus acidophilus*)、両ファーマンクム(*fermentum*)、両サリヴァリス(*salivarius*)、両プランクム(*planctum*)、両カゼイ(*casei*)、両ブレビス(*brevis*)、両ブルガリクス(*bulgaricus*)、両ヘルベチクス(*helveticus*)等が使用される。

図学的性質

本発明微生物の一般的図学的性質は、同一分類につき各知各文庫の示すものと同一の諸性質を有する。

すなわち、本発明微生物の一般的図学的性質及び培養法等に関しては、下記文献が参照される。

- 1) Bergey's Manual of Descriptive Bacteriology, 5th ed., 490-498 (1974)
- 2) Int. J. Syst. Bact., 15, 114 (1966)
- 3) Poopard, J. A., Hussain, I. and Norris, R. F., Bacteriol. Rev., 21, 126-135 (1973)
- 4) 光岡周知, 日本細菌誌 15, 261-283 (1959)

ここで菌体図像につきその主な図学的性状を要約して第2頁至第4頁に示す。

以下余白

これらのうち特に有用な菌株を微生物研究番号と共に表示すれば、下記の通りである。

第1表

菌株名	受託番号
<i>Streptococcus faecium</i> AD1008	FERM P-8560
<i>Streptococcus avium</i> AD2007	FERM P-8570
<i>Streptococcus mitis</i> AD7002	FERM P-8571
<i>Streptococcus faecalis</i> AD8005	FERM P-8572
<i>Bifidobacterium breve</i> AD8055	FERM P-8573
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> AD8052	FERM P-8574
<i>Bifidobacterium longum</i> AD0058	FERM P-8575
<i>Lactobacillus acidophilus</i> AD8005	FERM P-8568
<i>Lactobacillus fermentum</i> AD8007	FERM P-8569
<i>Lactobacillus casei</i> AD8008	FERM P-8568
<i>Lactobacillus salivarius</i> AD8009	FERM P-8569
<i>Lactobacillus plantarum</i> AD8010	FERM P-8567
<i>Lactobacillus brevis</i> AD8011	FERM P-8566

特開昭62-145026(3)

表2.3

	S. <i>faecalis</i> A D 1008	S. <i>faecalis</i> A D 3003	S. <i>avium</i> A D 2007
グラム染色	+	+	+
カタラーゼ(遊泳血吸芽菌下)	-	-	-
10℃での増殖	+	+	+
43℃での増殖	+	+	+
pH9.6での増殖	+	+	+
0.5% NaClでの増殖	+	+	+
10%胆汁における増殖	+	+	+
1/400細菌数での増殖	-	+	-
0.1%メチレンブルーミルグでの増殖	+	+	-
炭水化物発酵			
アラビノース	+	-	+
グリセリン	-	+	+
ラフィノース	+	+	+
ソルビット	-	+	+
エスケリン加水分解	+	+	+
アルギニン加水分解	+	+	-

菌株名	S. <i>faecalis</i> A D 1008	S. <i>faecalis</i> A D 3003	S. <i>avium</i> A D 2007
グラム染色	+	+	+
カタラーゼ(遊泳血吸芽菌下)	-	-	-
10℃での増殖	+	+	+
43℃での増殖	+	+	+
pH9.6での増殖	+	+	+
0.5% NaClでの増殖	+	+	+
10%胆汁における増殖	+	+	+
1/400細菌数での増殖	-	+	-
0.1%メチレンブルーミルグでの増殖	+	+	-
炭水化物発酵			
アラビノース	+	-	+
グリセリン	-	+	+
ラフィノース	+	+	+
ソルビット	-	+	+
エスケリン加水分解	+	+	+
アルギニン加水分解	+	+	-

特開昭 62-145026 (C)

添加液

KH ₂ PO ₄	4.5g
Na ₂ HPO ₄	6.0g
レーシステイン塩酸塩	0.5g
フィーンS O	0.5g
窒素	1.0g
精製水	1.000ml

K M N agarの組成

NaNO ₃	0.2g
トリプトース	15.0g
肉エキス	3.0g
NaCl	5.0g
スクムミルグ	15.0g
ニュートラルレッド	40mg
カヤマイン	24mg
窒素	15g
pH 7.0、1.000ml処方	

Na ₂ SO ₄ ・2H ₂ O	0.4g	0.5ml
NaCl	0.5g	
精製水	250ml	

0.1% リサズリン	0.1ml
ビオチン	0.01mg
パントテン酸カルシウム	0.2mg
リボフラビン	0.1mg
アデニン	0.1mg
グアニン	0.1mg
キサンチン	0.1mg
ウラシル	0.1mg
フィーンS O	0.1g
10% ビルビン酸	0.1ml
8% Na_2CO_3	5.0ml
3% レーシステイン塩酸塩	1ml
ナリジクス酸	10mg
1.5%プロムクレゾールブルー	0.1ml
窒素	2g
pH = 6.8、1.000ml処方	

L M S agarの組成

トリプトース	10g
肉エキス	5g
KH ₂ PO ₄	5g
フェニルアミンモニウム	2g
グルコース	20g
亜硫酸ナトリウム	15g
ツイン	8g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	57.5mg
MnSO ₄ ・2H ₂ O	120mg
FeSO ₄ ・7H ₂ O	34mg
窒素	15g
pH 5.5、1.90ml処方	

M P N agarの組成

ラクトース	2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5g
K ₂ HPO ₄	0.1g
MgSO ₄ ・7H ₂ O	10g
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.5g

媒体組成

培養液乃至培養基原料等として使用の本発明微生物の生媒体及び死菌体の各調製法の1例を示すは次の通りである。

1. 生媒体調製例

前記微生物等の菌体を前記のロゼタ媒体塩(L-ascorbic11-ateの弱塩)若しくはG A M媒体塩地(B ifidobacteriumの場合)5gに接種し、37℃にて8時間培養し、好気的又は嫌氣的に培養培養し、後者は培養培養して在菌液10⁴/mlの培養液をつくり、得られた培養液を12.5%の亜硫酸ナトリウムに封入し菌体を調製、生媒体培養液で洗浄した後、生媒体培養液に懸濁して該50ml(10⁴/ml)を得る。

2. 死菌体(熱処理菌体)調製例

上記1の生媒体調製例に従って得られた菌体を生媒体培養液で2回洗浄した後、生媒体培養液(0.85% NaCl水溶液)に懸濁して得られる菌液50ml(10⁴/ml)を121℃で10分間加熱し、死菌体懸濁液を得る。

特開昭62-145026(θ)

薬理作用

1. 実験結果

後記実験例に示す通り、本発明の抗発癌剤は、ジメチルニトロソアミンの体内レベルを極めて効果的に低下せしめるものであり、したがって、消化器癌（とくに胃癌、肝臓癌）を初めとする癌の予防薬として有用なものと云い得る。

本発明剤は又、傷口、断指等の手術で適用され得、その用途は凍瘡、1.5mg/10g体重、より時または1.00~1.5/10g体重濃度であり、その形態としては、生理食塩水等への懸濁液剤、凍結乾固等による粉末剤、錠剤、錠剤、カプセル剤等々、通常の剤型を適当なキャリア、増量剤、賦形剤等と共に適宜選択適用し得る。

2. 急性毒性

後記実験例に示す通り、本発明剤のLD₅₀は生体より成るものの場合3.1~7.2mg/マウス(腹腔内投与)、死傷体より成るものの場合はいずれの値にあっても50mg/マウス(腹腔内投与)以上である。

又、腹腔投与の場合は生個体、死個体とも実質的に無毒性である。

実験例1

①. *Incisus* A D 1000, ②. *Incisus* A D 9005, ③. *Incisus* A D 1007を前記死個体試験例に従って、加島地産生体試験液を得、これを死個体試料(生体試料濃度3mg/ml)とした。これらの試料にジメチルニトロソアミン84μgを添加し、37℃にて1時間反応させた後、凍干分離し、その上清につき、紫外線吸収(215nm)を測定した。ジメチルニトロソアミン80μg添加のみの紫外線吸収を100として、死個体試料添加による減少率、及び減少率(%)を計算した。その結果を第5表に示す。

第5表

試料名	ジメチルニトロソアミン減少量 (μg)	減少率 (%)
①. <i>Incisus</i> A D 1000	53.4	66.8
②. <i>Incisus</i> A D 9005	37.9	47.1
③. <i>Incisus</i> A D 1007	56.5	70.0

なお同程度の生個体試験液についても前記第5表と同様な結果を得る。

実験例2

①. *Adolescentis* A D 0051, ②. *Adolescentis* A D 0055, ③. *Incisus* A D 4056の前記死個体試験例に従って得た死個体試験液について、前記加島地産生体と調製の方法でジメチルニトロソアミン減少量及び減少率(%)を測定した。

その結果を第6表に示す。

第6表

試料名	ジメチルニトロソアミン減少量 (μg)	減少率 (%)
①. <i>Adolescentis</i> A D 0051	37.6	72.0
②. <i>Adolescentis</i> A D 0055	43.4	54.3
③. <i>Incisus</i> A D 4056	40.8	50.1

なお同程度の生個体試験液についても前記第6表と同様な結果を得る。

実験例3

①. *Acidophilus* A D 0006, ②. *fermentus* A D 0007, ③. *salivarius* A D 0008, ④. *hirsutus* A D 0011の前記死個体試験例に従って得た加島地産生体試験液について、前記実験例1と同様な方法でジメチルニトロソアミン減少量及び減少率(%)を測定した。

その結果を第7表に示す。

第7表

試料名	ジメチルニトロソアミン減少量 (μg)	減少率 (%)
①. <i>Acidophilus</i> A D 0006	38.2	35.2
②. <i>fermentus</i> A D 0007	24.2	30.3
③. <i>salivarius</i> A D 0008	27.3	34.1
④. <i>hirsutus</i> A D 0011	24.6	30.8

なお同程度の生個体試験液においても前記第7表と同様な結果を得る。

特開増 62-145026 (7)

実験例 1

101系マウス(雄6週令、平均体重31.0±0.5g)を用い、菌生菌体培養液に乾って得られた生菌体をマウス当たり10mg、1mg、0.1mgの3段階の生菌体(各群10匹)を含む生食食料を投与後5、5mgを腹腔内投与し、14日間マウスの生死を観察した。

Dohrose-Käfer法に従って得られたD₅₀値(菌体菌量/マウス)を第3表に示す。

尚、死菌体の場合は、いずれの値にあってもD₅₀値は50mg/マウス以上(腹腔内投与)であり、腸口投与ではいずれの場合でも実質的に無毒であった。

第3表

<u>S. faecalis</u> A D 1488	7.4 mg
<u>S. typhimurium</u> A D 2087	7.2 mg
<u>B. adolescentis</u> A D 0052	4.4 mg
<u>B. lowryi</u> A D 0055	3.2 mg
<u>L. acidophilus</u> A D 8006	6.6 mg
<u>L. casei</u> A D 9048	5.0 mg

試験例

1. 前記生菌体培養液に乾って得られたB. adolescentis A D 0052生菌体又は死菌体の菌体乾留物5mg(菌体数 5×10^{10} 個に相当)を切製でんぶ米950mgと均一に混合、打錠して経口投与用錠剤とした。この錠剤は体重50kgの成人における用量 10^{10} 個/kgに相当する。

2. 上記菌体乾留物50mgを切製でんぶ米500mgと混合、打錠したものは、同様に用量 10^{10} 個/kgに相当する。

このように、本発明剤は菌体菌体菌量等に易づいて、菌体と菌体とに許容される菌体とを混合して所定の活性を有する所望の剤型とすることが出来る。

特許出版人 株式会社アドバンス開発研究所